

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791489

研究課題名(和文)肝細胞移植が障害肝および外科侵襲に与える影響に関する研究

研究課題名(英文)Research of hepatocyte transplantation for injured liver and surgical stress .

研究代表者

中村 幸雄 (NAKAMURA, YUKIO)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50516648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：近年の肝細胞癌治療においては非ウイルス性肝炎・肝硬変を背景とした外科治療が課題になっている。肝再生置換の臨床応用に向けた基礎研究にむけて、ヒトNASH/NAFLDに近似したラットモデルを作成し、肝細胞移植による肝再生置換モデルを作成した。肝幹細胞と成熟肝細胞による再生置換率は、成熟肝細胞の方が良かった。また、胆管系細胞への影響を細胞生物学的に明らかにした。NASHによる肝硬変モデルの生存率を高めることに成功した。臨床研究では、ドナー細胞の採取法に関する利点と欠点に関して報告した。BTR, ATIII, GSAの臨床意義や様々な肝機能因子をクラスターリングすることで分類を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In recently, surgical management of hepatocellular carcinoma should be addressed for non-viral hepatitis and liver cirrhosis. We attempt to apply liver replacement therapy using hepatocyte transplantation for clinical therapy. In order to achieve it, we developed rat liver replacement model which imitated clinical human NASH/NAFLD. In this model, we revealed a cell physiology of the transplanted cells which generated bile duct lineage cells. In addition, we succeeded to increase survival rate in NASH liver cirrhotic model. In the clinical research, we reported a benefit and default of donor cell procurement. We also revealed that a clinical value of BTR, ATIII, and GSA. We classified various liver functional indicators using clustering analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：肝臓外科学

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の外科療戦略は肝細胞癌の長期予後が肝機能に規定されていることから、腫瘍学的な肝内転移の高危険領域を必要十分に含めることと残存肝機能を最大限に温存することのバランスを考慮することにある。したがって、肝機能の評価方法と改善方法の確立が研究対象となっている。肝機能の評価法には、古典的方法の他に本邦で普及した ICG 検査を加えた肝障害度に肝移植の適応基準として提唱される予後を予測した MELD や PELD スコアが存在する (Mizuguchi T, et al. World J Surg 2004;28:971-6.)。肝硬変における肝再生はウイルス性肝硬変が進行すると類洞周囲に線維化が生じて肝機能の悪化が相関することが知られている。肝硬変の指標としての線維化マーカーとしてはコラーゲン、ヒアルロン酸、HGF、血小板などが報告されている。肝硬変に対する肝切除術では肝再生が不良であり (Kawamoto M, et al. Liver Int 2006;26:203-10.)、これが術後肝不全の病態と考えられている。肝線維化マーカーは、単なる肝硬変の進行を示すのみならず、肝細胞癌の発癌にも関係していると考えている (Kikkawa Y, et al. Exp Cell Res 2008;314:2579-90.)。HGF は、肝硬変の進行に比例して上昇することが知られており (Kawamoto M, Mizuguchi T, et al. World J Gastroenterol 2006;12:4325-30.)、これが細胞増殖そのものを促進している可能性がある。ヒアルロン酸は、全身で産生され類洞内皮細胞で代謝されることから線維化を反映した類洞内皮細胞障害を反映した指標である。ヒアルロン酸も HGF 同様に肝硬変に比例して上昇するが、ヒアルロン酸受容体は CD44 であり幹細胞の表面抗原マーカーとして知られている (Kon J, Mitaka T, et al. Am J Pathol. 2009;175:2362-71.)。したがって、CD44 を介した肝硬変時の肝細胞癌の発癌への関連性が強く示唆される。

一方で、肝硬変に付随した肝線維化を背景とした肝機能悪化例に対しては肝移植以外では有効な治療法がない。また、肝線維化の改善方法も小動物モデルで多くの薬物療法が示されているもののヒト臨床応用されたものはない (Kikuchi H, et al. Wound Repair Regen 2007;15:881-8.)。肝移植時のドナー不足は深刻で、非代償期の肝機能を改善させる治療法の開発や臓器移植に代替できる安全かつ有効な細胞治療法の開発 (Shibata C, Mizuguchi T, et al. Liver Transpl 2006;12:78-87.) が望まれている。

肝硬変に対して細胞機能を補填するような治療により、移植以外の代替治療法の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、これまでの研究で開発してきた肝細胞移植による肝再生置換モデルを作成し、肝硬変を併存した外科治療による死亡率の改善を図るものである。ヒト NASH/NAFLD に近いとされた、コリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食 (以下 CDAA 食) によるモデルが臨床像と類似することを確認することも一つの目的となる。投与量あるいは投与期間による肝線維化の程度や機能発現解析によって、モデルの類似性や正確性を明らかにする。

次に、移植細胞のプレパレーション・移植投与方法・移植投与部位・肝切除量の各ステップにおいてヒト臨床に近似したモデル作成のための条件決定を行うことを次の目標とした。さらに、肝切除後の予後と細胞機能解析を短期・長期にわたり研究し、移植細胞がレシピエントに与える影響を確認することを最終目的とし、将来の臨床応用に向けた前臨床研究を兼ねた基礎研究とした。併せて、日常臨床上の問題を明らかにするために臨床研究も行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 概要

NASH/NAFLD モデルには CDAA 食を投与したラットを施行した。雄肝細胞を分離し、メスの CDAA 食投与ラットに一定の肝切除を施行することで生存率を確認するとともに組織を採取し、解析として細胞レベル、蛋白レベル、遺伝子発現レベルで行い、固有の分子反応や分子機序を解明した。

### (1) 肝細胞分離方法

メスラット肝臓に前灌流を行う。確立された方法であるので、概要のみを記載する。コラゲナーゼ灌流法により行う。(Sugimoto S, et al. Tissue Eng., 2005; 11: 626-33.)

### (2) CDAA 投与ラット

CDAA を食事として給仕し、4 週、8 週、10 週、12 週と線維化の程度や肝炎の活動度を組織レベルで評価した。

### (3) 細胞障害評価

細胞の一部は蛍光標識による Dead/Alive cell 検出キットにより生存率を決定する。逸脱酵素の測定と細胞状態の形態学的検討をおこなった。

### (4) アポトーシス確認評価

アポトーシスの確認として Tunnel 染色キットにより組織レベルで評価するとともに、Cleaved Caspase3 および Annexin V のタンパク発現を評価した。

### (5) 肝細胞移植後の肝切除評価

肝細胞移植は、脾臓内に  $2 \times 10^7$  を移植した。24 時間後には 68% 肝切除を施行した。コントロールとして、正常食ラットあるいは Sham としての生食のみの注入を行った。

### (6) 再生置換化効率の検証

採取された組織は、SRY primers: sense, 5' -CAGAGATCAGCAAGCATCTGG-3'; anti-sense, 5' -TCTGGTCTTGAGGACTGG-3' を用いた PCA によって雄細胞すなわち移植細胞の占有率を評価した。

### (7) 遺伝子蛋白発現解析・ケモカイン測定

核タンパク質を抽出し、肝特異的転写因子 (HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ , HNF4, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ ) および細胞周期関連タンパク質 (Cyclins) の発現を Western blot 法

で確認する。

#### 4 . 研究成果

ドナー細胞の生着や機能維持にかかる因子としてアミノ酸のバランスに着目した。BTR を測定することで、肝機能と発癌の関係と術後の合併症に関しての関係を明らかにした ( J Gastroint Surg 2011; 15:1433-9. )。さらに、肝機能因子をクラスター解析によって新たな部類を考案し発表した ( Surgery 2011; 150: 250-62. )。ATIII は、抗凝固因子として重要であるが、その蛋白発現と肝機能との関係を明らかにした。肝組織採取時における熱焼灼デバイスの安全性を検証した ( Hepatogastroenterology 2012; 59 :551-7. )。熱焼灼デバイスは、肝切除後の肝再生を遅らせる影響があるが、少量ステロイド投与により影響を排除することに成功した ( World J Gastroenterol. 2012; 18: 905-14. )。ドナー採取時の背景肝は術後の合併症と長期予後に影響し、正常肝の場合には技術的な問題に注意が必要である ( World J Surg. 2013; 37: 1379-87. )。また、ドナー細胞採取時の全身管理として新たなモニタリング評価法を発表した ( Surgery. 2013; 154: 351-62. )。腹腔鏡による安全な肝切除を行うための新規デバイスを考案した ( Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2013 : in press )。基礎研究では、肝細胞移植によって肝再生置換モデルを作成し、肝幹細胞と考えている小型肝細胞と成熟肝細胞の生着様式を比較した。成熟肝細胞の方が生着率は高く、今後の移植細胞源にどの細胞を選択していくかに関して新たな課題が生まれた ( Hepatology. 2013; 57:1192-202. )。肝細胞移植時の胆管系細胞への影響や細胞生理に関して発表した ( J Cell Sci. 2013 Sep 17. )。肝細胞移植によって NASH による肝硬変の肝不全を救命できることと肝細胞置換が起きていることを証明した ( Cell Transplant. 2013 Jun 13. )

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 11 件 )

Mizuguchi T, Kawamoto M, Nakamura Y, Meguro M, Harada K, Ota S, Hui TT, and Hirata K. New technique of extracorporeal hepatic inflow control for pure laparoscopic liver resection. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 査読有、2013 (in press).

Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Kon J, Hirata K, Mitaka T. Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. Hepatology, 査読有、2013; 57:1192-202. doi: 10.1002/hep.26084.

Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatic biliary

epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. J Cell Sci, 査読有、2013;126:5239-46. doi: 10.1242/jcs.133082.

Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Ota S, Hui TT, Hirata K. Prognosis and Predictors of Surgical Complications in Hepatocellular Carcinoma Patients With or Without Cirrhosis after Hepatectomy. World J Surg, 査読有、2013; 37: 1379-87. doi: 10.1007/s00268-013-1989-6.

Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, Nakamura Y, Ota S, Kukita K, Ishii M, Tatsumi H, Hirata K. Continuous monitoring of central venous oxygen saturation predicts postoperative liver dysfunction after liver resection. Surgery, 査読有、2013;154:351-62. doi: 10.1016/j.surg.2013.04.039.

Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ichinohe N, Ooe H, Kawamoto M, Meguro M, Hirata K, Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation improves the survival of rats with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis after partial hepatectomy. Cell Transplant, 査読有、2013 Jun 13. doi: 10.3727/096368913X668649.

Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Son S, Nakamura Y, Harada K, Shibata T, Ota S, Hirata K. Serum antithrombin III level is well correlated with multiple indicators for assessment of liver function and diagnostic accuracy for predicting postoperative liver failure in hepatocellular carcinoma patients. Hepatogastroenterology, 査読有、2012; 59 :551-7. doi: 10.5754/hge10052.

Shibata T, Mizuguchi T, Nakamura Y, Kawamoto M, Meguro M, Ota S, Hirata K, Ooe H, Mitaka T. Low dose steroid pretreatment ameliorates transient impairment of the liver regeneration due to radiofrequency ablation. World J Gastroenterol, 査読有、2012; 18: 905-14. doi: 10.3748/wjg.v18.i9.905.

Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Shibata T, Nakamura Y, Kimura Y, Furuhashi T, Sonoda T, Hirata K. Laparoscopic hepatectomy: a systematic review, meta-analysis and power analysis. Surg Today, 査読有、2011; 41: 39-47. doi: 10.1007/s00595-010-4337-6.

Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Harada K, Kukita K, Hirata K. Prognostic impact of preoperative branched-chain amino acids to the tyrosine ratio level in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy. J Gastroint

Surg, 査読有、 2011; 15:1433-9. doi: 10.1007/s11605-011-1566-y.

Nakamura Y, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Harada K, Ota S, Hirata K. Cluster analysis of liver functional indicators and preoperative low BTR indicate high risk of early recurrence in analysis of 165 HCC patients after initial hepatectomy. Surgery, 査読有、 2011; 150: 250-62. doi: 10.1016/j.surg.2011.06.001.

〔学会発表〕(計4件)

Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, Nakamura Y, Kukita K, Ota S, Hirata K. Continuous monitoring of central venous oxygen saturation predicts postoperative liver dysfunction after liver resection. 8th Annual Academic Surgical Congress, Oral presentation, New Orleans, LO, USA, February 5-7, 2013.

Nakamura Y, Mizuguchi T, Ohe H, Kawamoto K, Meguro M, Ota S, Mitaka T, Hirata K. Hepatic Progenitor Cell Transplantation for Improving Survival after Liver Resection of Rat Non-alcoholic Steatocirrhotic Liver Model. 7th Annual Academic Surgical Congress, Quick shot oral presentation, Las Vegas, NV, USA, February 14-16, 2012.

Mizuguchi T, Kawamoto K, Meguro M, Nakamura Y, Harada K, Nobuoka T, Kimura Y, Furuhashi T, Hirata K. Extracorporeal hepatic inflow control method for pure laparoscopic liver resection. 7th Annual Academic Surgical Congress, Quick shot oral presentation, Las Vegas, NV, USA, February 14-16, 2012.

〔図書〕(計0件)  
該当者なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 幸雄 (NAKAMURA, Yukio)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号： 50516648

(2) 研究分担者  
該当者なし

(3) 連携研究者  
該当者なし